

Bartosz Głab

**Charakterystyka biochemiczna i potencjalne znaczenie
fizjologiczne acylotransferaz
acylo-CoA:glicerolo-3-fosfocholiny.**

Promotor: prof. dr hab. Antoni Banaś

Kopromotor: prof. Anders Carlsson

STRESZCZENIE

Fosfatydylocholina (PC) jest głównym lipidem eukariotycznych membran oraz pełni centralną funkcję w metabolizmie lipidów roślinnych. Jest miejscem działania różnego rodzaju desaturaz – enzymów błonowych produkujących nienasycone, wielonienasycone i nietypowe kwasy tłuszczowe (PUFA, ang. *polyunsaturated fatty acids*). Kwasy te są obiektem zainteresowania naukowców ze względu na wpływ na zdrowie człowieka, a także możliwe wykorzystanie w przemyśle. Glicero-3-fosfocholiny (GPC) jest produktem całkowitej deacylacji fosfatydylocholiny (PC). Przez długi czas obowiązywał pogląd iż GPC nie jest substratem do bezpośredniej resyntezy PC, do czasu niedawnego odkrycia w drożdżach piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*) aktywności acylotransferazy acylo-CoA:glicerofosfocholiny (GPCAT) (Stålberg i wsp., 2008), która to prowadzi do resyntezy cząsteczki PC, omijając etap jakim jest degradacja GPC do wolnej choliny, aktywacja choliny do CDP-choliny i transfer choliny na cząsteczkę diacyloglicerolu (DAG). Pomimo prób wytypowania enzymu odpowiedzialnego za tę reakcję zespołowi Stalberga (Stalberg i wsp. 2008) nie udało się wskazać odpowiedniego białka. Gen odpowiedzialny za syntezę GPCAT u drożdży został zidentyfikowany w 2014 przez zespół prof. Stena Stymne z Szwedzkiego Uniwersytetu Rolniczego w Alnarp, którego byłem w tym czasie członkiem. Na podstawie homologii udało się nam później zidentyfikować geny roślinne (*Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Brassica napus*), które po wklonowaniu do wektora pYES 2.1. komplementowały delecję aktywności GPCAT w lini drożdżowej nieposiadającej tej aktywności (Głab i wsp. 2016).

Najważniejszym i przełomowym wynikiem prowadzonych przeze mnie badań było odkrycie całkowicie nowej, wcześniej nieopisanej aktywności acylotransferazy acylo-CoA:licerofosfocholina (GPCAT). Wykazałem istnienie reakcji transacylacji, przenoszącej reszty acylowe z innych lizofosfolipidów tj. lizofosfatydylocholiny (LPC), lizofosfatydyloetanolaminy (LPE), lizofosfatydyloseryny (LPS) na cząsteczkę GPC (Głąb i wsp., 2016). Odkryta aktywność wyjaśniała wcześniejsze dane na temat acylacji cząsteczki GPC bez dodania acylo-CoA w testach z mikrosomami przygotowanymi z rozwijających się nasion roślin olejowych (Lager, Głąb et al. 2015).

W toku badań przeprowadzone zostały nie tylko doświadczenia wyjaśniające mechanizm reacylacji cząsteczki GPC, ale również wykonana została charakterystyka biochemiczna i określona została specyficzność substratowa drożdżowego GPCAT, a także jego homologicznej formy z rzodkiewnika pospolitego (*A. thaliana*) *rącznika pospolitego* (*Ricinus comunis*) oraz rzepaku (*Brassica napus*). Badana była dodatkowo aktywność typu GPCAT (acylacja GPC zależna i niezależna od acylo-CoA) we frakcjach microsomalnych z rozwijających się nasion *Carthamus tinctorius*, *Ulmus glabra*, *Crambe abyssinica* i *Camelina sativa* (w mikrosomach z nasion dwóch ostatnich gatunków aktywności typu GPCAT nie wykryto). W ramach pracy przeprowadzono zostało również szereg badań dotyczących prób ustalenia czy GPCAT posiada właściwości acylotransferazy typu LPC:LPC jako, że w testach zarówno z mikrosomami z drożdży jak i z mikrosomami z nasion posiadających aktywny GPCAT aktywność tego typu występowała. Uzyskano szereg poszlak, że za aktywność tą mogą być odpowiedzialne enzymy typu GPCAT ale nie udało się uzyskać ostatecznych dowodów potwierdzających lub negujących tą hipotezę. Ostatnim etapem badań było wykonanie doświadczeń mających na celu określenie wpływu wyłączenia i nadekspresji genu kodującego GPCAT w drożdżach piekarniczych oraz w rzodkiewniku pospolitym. W przypadku drożdży zaobserwowano różnice w tempie wzrostu oraz w składzie kwasów tłuszczowych (zwiększenie ilości nienasyconych kwasów tłuszczowych w drożdżach z delecją *gpc1*), ale jedynie w warunkach stresu osmotycznego. W przypadku roślin, zaobserwowano zmniejszenie ilość chloroplastowych galaktolipidów w roślinach zawierających insercje T-DNA w obrębie genu kodującego GPCAT (At5g35460), a także drastyczny spadek ilości produkowanych nasion u roślin z nadekspresją tego genu, w stosunku do roślin kontrolnych. Analiza morfologii roślin z obniżoną ekspresją enzymu oraz z nadekspresją nie wykazała istotnych różnic w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

Badania prezentowane w niniejszej pracy wykonywane były częściowo w Instytucie Hodowli Roślin Szwedzkiego Uniwersytetu Rolniczego w Alnarp a częściowo w Pracowni Biochemii Roślin MWB UG i GUMed.